Aus dem Hygienisch-Bakteriologischen Institut der Universität Bern
(Direktor: Professor Dr. C. Hallauer)

Experimentelle Untersuchungen über die entwicklungshemmende und keimtötende Wirkung des Äthylalkohols auf aerobe und anaerobe Sporenbildner unter besonderer Berücksichtigung menschenpathogener Anaerobier.

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Würde eines Doctor medicinae
der Universität Bern

vorgelegt von

Max Witz
aus Erlach (Bern)

Druck von R. Oldenbourg, München 1940

Aus dem Hygienisch-Bakteriologischen Institut der Universität Bern
(Direktor: Professor Dr. C. Hallauer)

Experimentelle Untersuchungen über die entwicklungshemmende und keimtötende Wirkung des Äthylalkohols auf aerobe und anaerobe Sporenbildner unter besonderer Berücksichtigung menschenpathogener Anaerobier.

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Würde eines Doctor medicinae
der Universität Bern

vorgelegt von

Max Witz
aus Erlach (Bern)

Druck von R. Oldenbourg, München 1940

Auf Antrag des Herrn Professors Dr. C. Hallauer von der medizinischen Fakultät zum Druck als Dissertation genehmigt.

Bern, den 28. Februar 1940.

Der Dekan der medizinischen Fakultät:

Prof. Dr. J. Klaesi

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Im neueren Schrifttum mehren sich die Angaben, wonach Gasbrandinfektionen beim Menschen im Anschluß an medikamentöse Injektionen keine Seltenheit darstellen. Die Kasuistik dieser Fälle wurde kürzlich von R. Regamey (18) zusammengestellt. Von diesem Autor wurde auch die Frage diskutiert, unter welchen Umständen derartige Infektionen zustande kommen, und hierbei vor allem darauf hingewiesen, daß der Alkohol als Desinfektionsmittel für Instrumente und Injektionsspritzen als unzuverlässig abgelehnt werden muß und mit Sicherheit als Infektionsquelle für Gasbrandinfektionen in Betracht zu ziehen ist. Tatsächlich vermochte Regamey bei zwei von drei Fällen von „Injektionsgasbrand" B. perfringens im Alkohol des Spritzenbehälters bzw. in den Kanülen der in Alkohol konservierten Injektionsspritze nachzuweisen.

Unter diesen Umständen erschien es notwendig, die entwicklungshemmende und bakterizide Wirkung von Äthylalkohol gegenüber einer größeren Anzahl von aeroben und anaeroben Sporenbildnern, und namentlich von menschenpathogenen Arten, in systematischer Weise zu prüfen.

Versuche.

1. Keimgehalt des zu Desinfektionszwecken verwendeten Alkohols.

Daß der im Handel befindliche Alkohol oft nicht steril, sondern häufig keimhaltig ist, wurde wiederholt festgestellt. Stokvis (23) hat wohl erstmalig nachgewiesen, daß 99% Alkohol B Megatherium

Tabelle 1.

		Alkoholprobe						Isolierte Keimart
		10 ccm	2,0 ccm	1,0 ccm	0,5 ccm	0,2 ccm	0,1 ccm	
1.	aerob	+	+	+	+	0	0	B. mesentericus
	anaerob	+	+	+	0	0	0	B. mesentericus
2.	aerob	+	+	+	+	+	+	B. mesentericus
	anaerob	+	+	+	+	+	+	B. mesentericus
3.	aerob	+	—	+	—	—	—	B. subtilis
	anaerob	+	—	—	—	—	—	B. perfringens
4.	aerob	+	+	+	+	+	—	B. mesentericus
	anaerob	+	+	+	+	+	—	B. mesentericus
5.	aerob	+	+	+	+	+	+	B. mesentericus
	anaerob	+	—	—	—	—	—	B. mesentericus
6.	aerob	+	+	+	+	—	—	B. mesentericus
	anaerob	+	+	+	+	+	+	B. mesentericus
7.	aerob	+	+	+	+	—	—	B. mesentericus
	anaerob	+	+	+	+	—	—	B. mesentericus
8.	aerob	+	—	—	—	—	—	B. mesentericus
	anaerob	+	—	—	—	—	—	B. mesentericus
9.	aerob	+	—	—	—	—	—	B. subtilis; gram ± und gram + sporulierende Stäbchen
	anaerob	+	—	—	—	—	—	
10.	aerob	+	—	+	—	—	—	B. subtilis; gram ± und gram + sporulierende Stäbchen
	anaerob	+	+	+	—	—	—	
11.	aerob	+	—	—	—	—	—	gram ± sporulierende Stäbchen
	anaerob	—	—	—	—	—	—	
12.	aerob	+	—	—	—	—	—	B. mesentericus
	anaerob	+	—	—	—	—	—	B. mesentericus
13.	aerob	+	+	+	+	+	—	Sarcina
	anaerob	+	+	+	+	—	—	Sarcina
14.	aerob	+	+	+	+	+	+	B. subtilis; gram + sporulierende Stäbchen
	anaerob	+	+	+	+	—	—	
15.	aerob	—	—	—	—	—	—	steril
	anaerob	—	—	—	—	—	—	steril

Provenienz der untersuchten Alkoholproben:
Probe 1: Alkohol abs. 99,6% (P. H. V.) aus der Apotheke.
Probe 2: Industriespiritus aus dem Hyg. Institut Bern.
Proben 3–15: Alkoholproben aus verschiedenen Berner Kliniken.

enthalten kann. Knorr (10) wies ebenfalls auf die mangelnde Sterilität des Alkohols hin. Auch Kuhn (13) fand bei 36 Proben von 70—96proz. Alkohol des Handels mehr als die Hälfte mit den verschiedensten Keimarten (B. subtilis, B. mesentericus, schwärmende Sporenbildner) verunreinigt. Ähnliche Befunde erhoben Schoop

(20a) und Konrich (12b), indem es auch diesen Autoren gelang, in zahlreichen Alkoholproben aerobe und anaerobe Sporenbildner und — seltener — sporenfreie Bakterien nachzuweisen. Venohr (25) stellte fest, daß Alkoholproben um so häufiger infiziert sind, je geringer deren Alkoholgehalt ist; so wurde 96proz. Alkohol in 40%, 90proz. in 70% und 60proz. in 90% aller Proben keimhaltig befunden. Allgemein wird angenommen, daß der ursprünglich sterile Alkohol sekundär infiziert wird, entweder bei der ohne besondere Kautelen vorgenommenen Umfüllung (Kuhn) oder bei der nachträglichen Verdünnung mit nicht sterilem destilliertem Wasser (Venohr).

In eigenen Versuchen wurde geprüft, mit welcher Häufigkeit die im Handel befindlichen und in den Berner Kliniken zur Sterilhaltung von Instrumenten und Injektionsspritzen verwendeten Alkohole keimhaltig sind, und welche Keimarten aus derartigen Alkoholproben isoliert und gezüchtet werden können.

Untersuchungstechnik. Sämtliche Alkoholproben wurden auf flüssige Nährböden — für den Nachweis von aeroben Keimen auf gewöhnliche Nährbouillon (pH 7,4); von Anaerobiern auf Tarozzibouillon — in den folgenden Mengen übertragen: je 10 ccm Alkohol auf 200 ccm, je 2,0—1,0—0,5—0,2 und 0,1 ccm Alkohol auf ca. 12 ccm Nährbodenflüssigkeit. Nach der Beimpfung wurden die Nährbodengefäße mit Pergamentpapier verschlossen und während 3 Wochen bei 37° C bebrütet. Die täglich kontrollierten Kulturen wurden, sofern sie eine Trübung zeigten, mikroskopisch untersucht und zur Identifizierung der gewachsenen Keime auf aerobe und anaerobe (Fortner) Blutplatten abgeimpft.

Die erzielten Versuchsergebnisse sind in Tabelle 1 wiedergegeben.

Wie aus der Tabelle hervorgeht, erwies sich unter den 15 untersuchten Alkoholproben nur eine einzige als steril. Der Keimgehalt der übrigen 14 Proben war unterschiedlich:

4	Proben	enthielten	ca.	10000	oder	mehr	Keime	pro Liter
2	„	„	„	5000	„	„	„	„ „
2	„	„	„	2000	„	„	„	„ „
2	„	„	„	1000	„	„	„	„ „
4	„	„	„	100	„	„	„	„ „

Hinsichtlich der Keimart wurden hauptsächlich B. mesentericus und B. subtilis, in einigen Fällen auch Sarcinen und saprophytäre, nicht näher identifizierte Sporenbildner isoliert. Von besonderem Interesse ist nun aber vor allem der einmal gelungene Nachweis von B. perfringens in einer Alkoholprobe, die einem Spritzenbehälter einer klinischen Abteilung entstammte. Der isolierte Gasbrandbazillus zeigte für Meerschweinchen eine hohe, unabgeschwächte Pathogenität. Um so beachtenswerter ist die Feststellung, daß sich auf der betreffenden Abteilung kein Fall von Gasbrand ereignete,

obschon der mit B. perfringens infizierte Alkohol noch eine zeitlang zur Aufbewahrung von Injektionsspritzen verwendet wurde, ein Hinweis dafür, daß zur Auslösung eines „Injektionsgasbrandes" noch andere Bedingungen (vgl. Regamey) erfüllt sein müssen.

2. Entwicklungshemmende Wirkung von Äthylalkohol auf aerobe und anaerobe, größtenteils menschenpathogene Sporenbildner.

Im folgenden sollte untersucht werden, bei welcher Alkoholkonzentration im Nährboden das Wachstum und die Vermehrung sporulierender Keime unterdrückt wird.

Technik.

Alkohol: Für sämtliche Versuche wurde ein aus der Apotheke bezogener Alkohol von 99,5 Volumprozent (P.H.V.) verwendet. Die 5—40proz. Alkoholverdünnungen sind volumetrisch angegeben. Die Entkeimung des Alkohols geschah durch Seitzfiltration.

Testbakterien: Zu den Versuchen wurden die folgenden sporulierenden Bakterienstämme[1]) verwendet:

B. perfringens Gruppe	B. perfringens	A (A1; A2)
	,, ,,	B (B4; B 304)
	,, ,,	C (C5; C 305)
	,, ,,	D (D6; D 306)
	B. ovitoxicus	(O7; O 307)
Vibrion-septique-	Vibrion septique	(13 I; 12; 312)
B. Chauvoei-Gruppe	B. Chauvoei	(18; 19; 20)
B. Novyi-Gruppe	B. oedematiens	(14; 15; 314)
	B. hemolyticus	(21; 22)
	B. gigas	(23; 24)
Proteolytische	B. Sordellii	(13/7; 13/8)
Anaeroben-Gruppe	B. histolyticus	(8 I; 8 II; 9 I; 9 II)
Tetanusbazillen	B. tetani	(25; 26; 427)
Gruppe aerober	B. anthracis	(Gutknecht-Steffen)
Sporenbildner	B. subtilis	(S1; S2)
	B. mesentericus	(M1)

Nährboden: Zur Züchtung der Anaerobier bzw. Aerobier diente Leber-Leberbouillon bzw. gewöhnliche Nährbouillon (pH 7,4). Die anaeroben Kulturmedien wurden mit Paraff. liquid. überschichtet, die aeroben Kulturgefäße mit einem paraffinierten Wattepfropfen — zur Verhinderung der Alkoholverdunstung — verschlossen.

Beimpfung: Vor Versuchsbeginn wurden sämtliche Kulturmedien während 24 Stunden unbeimpft — zur Sterilitätskontrolle — im Brutschrank bei 37° C gehalten. Zur Beimpfung der mit Alkohol versetzten Nährmedien dienten je 0,5 ccm dreitägiger Kulturen. Das Gesamtvolum jedes mit unterschiedlich großen Alkoholmengen (5—40 Vol.-%) und mit einer gleichbleibenden Menge

[1]) Für die Überlassung einer größeren Anzahl dieser Stämme sind wir mehreren Instituten (Inst. Rob. Koch, Berlin; Hyg. Bakt. Inst. Altona; Institut Pasteur, Paris) zu Dank verpflichtet.

Tabelle 2.

B. perfringens-Gruppe.

	Alkohol in Volumprozenten								Kontrolle	
	5 %	10 %	15 %	20 %	25 %	30 %	35 %	40 %	Leber-B.	Bouillon
B. perfringens A 1										
Nach 1 Tag	+++	+++	+++	0	0	0	0	0	+++	±
„ 1 Woche	+++	+++	++	±	0	0	0	0	+++	±
„ 1 Monat	++	+	±	0	0	0	0	0	+	—
B. perfringens A 2										
Nach 1 Tag	+++	+++	++	±	0	0	0	0	+++	±
„ 1 Woche	+++	+++	++	+	±	0	0	0	+++	±
„ 1 Monat	+	+	0	0	0	0	0	0	+	—
B. perfringens B 4										
Nach 1 Tag	+++	+++	+++	+	0	0	0	0	+++	+
„ 1 Woche	+++	+++	+++	++	±	0	0	0	+++	±
„ 1 Monat	+	+	±	0	0	0	0	0	+	—
B. perfringens B 304										
Nach 1 Tag	+++	+++	+++	+	0	0	0	0	+++	±
„ 1 Woche	+++	+++	+++	+	0	0	0	0	+++	—
„ 1 Monat	+	+	±	0	0	0	0	0	+	—
B. perfringens C 5										
Nach 1 Tag	+++	+++	+++	+	0	0	0	0	+++	±
„ 1 Woche	+++	+++	+++	++	±	0	0	0	+++	±
„ 1 Monat	+	+	0	0	0	0	0	0	+	—
B. perfringens C 305										
Nach 1 Tag	+++	+++	++	0	0	0	0	0	+++	±
„ 1 Woche	+++	+++	+++	±	0	0	0	0	+++	±
„ 1 Monat	+	+	0	0	0	0	0	0	+	—
B. perfringens D 6										
Nach 1 Tag	+++	+++	+	0	0	0	0	0	+++	+
„ 1 Woche	+++	+++	+++	+	0	0	0	0	+++	+
„ 1 Monat	+	+	0	0	0	0	0	0	+	—
B. perfringens D 306										
Nach 1 Tag	+++	+++	+++	±	0	0	0	0	+++	—
„ 1 Woche	+++	+++	+++	+	0	0	0	0	+++	—
„ 1 Monat	+	+	+	0	0	0	0	0	+	—
B. ovitoxicus O 7										
Nach 1 Tag	+++	+++	++	0	0	0	0	0	+++	—
„ 1 Woche	+++	+++	+++	0	0	0	0	0	+++	—
„ 1 Monat	+	+	0	0	0	0	0	0	+	—
B. ovitoxicus O 307										
Nach 1 Tag	+++	+++	+	0	0	0	0	0	+++	—
„ 1 Woche	+++	+++	++	0	0	0	0	0	+++	—
„ 1 Monat	+	+	+	0	0	0	0	0	+	—

von Kulturmaterial (0,5 ccm) beschickten Nährbodenröhrchens betrug stets 10 ccm.

Bewertung: Während der ersten Versuchswoche wurden die Kulturen täglich, späterhin nur noch wöchentlich auf Wachstum geprüft. Die Intensität

Tabelle 3.

Vibrion septique-B. chauvoei-Gruppe.

	Alkohol in Volumprozenten								Kontrolle	
	5%	10%	15%	20%	25%	30%	35%	40%	Leber-B.	Bouillon
Vibrion septique 12										
Nach 1 Tag	++	0	0	0	0	0	0	0	+++	—
„ 1 Woche	++	+	0	0	0	0	0	0	++	—
„ 1 Monat	+	0	0	0	0	0	0	0	+	—
Vibrion septique 13 I										
Nach 1 Tag	++	0	0	0	0	0	0	0	+++	—
„ 1 Woche	++	+	0	0	0	0	0	0	++	—
„ 1 Monat	+	0	0	0	0	0	0	0	+	—
Vibrion septique 312										
Nach 1 Tag	±	0	0	0	0	0	0	0	+++	—
„ 1 Woche	++	±	0	0	0	0	0	0	++	—
„ 1 Monat	+	0	0	0	0	0	0	0	+	—
B. Chauvoei 18										
Nach 1 Tag	++	0	0	0	0	0	0	0	++	—
„ 1 Woche	+++	0	0	0	0	0	0	0	+++	—
„ 1 Monat	+	0	0	0	0	0	0	0	±	—
B. Chauvoei 19										
Nach 1 Tag	++	0	0	0	0	0	0	0	++	—
„ 1 Woche	+++	0	0	0	0	0	0	0	+++	—
„ 1 Monat	+	0	0	0	0	0	0	0	+	—
B. Chauvoei 20										
Nach 1 Tag	++	0	0	0	0	0	0	0	++	—
„ 1 Woche	++	+	0	0	0	0	0	0	++	—
„ 1 Monat	+	0	0	0	0	0	0	0	±	—

des Bakterienwachstums wurde nach dem Trübungsgrad der Nährmedien wie folgt beurteilt:

+++ sehr starke Trübung
++ starke „
+ mäßige „
± angedeutete „
0 keine „

Die Ergebnisse dieser Versuche sind in den Tabellen 2—7 wiedergegeben.

Der entwicklungshemmende Einfluß von Alkohol auf die verschiedenen Arten von anaeroben Sporenbildnern ist aus der in Tabelle 8 gegebenen Übersicht klar zu erkennen.

Das Gesamtergebnis dieser Versuche kann dahin zusammengefaßt werden: 1. Daß die Empfindlichkeit gegenüber Alkohol bei den einzelnen Bakterienarten sehr unterschiedlich ist. Die geringste Alkoholtoleranz wurde bei vibrion septique, B. Chauvoei, B. hemolyticus, B. tetani und B. anthracis nachgewiesen; alle diese Arten erwiesen sich in einem 15proz. Alkohol enthaltenden Nährboden

Tabelle 4.

B. Novyi-Gruppe.

	Alkohol in Volumprozenten								Kontrolle	
	5%	10%	15%	20%	25%	30%	35%	40%	Leber-B.	Bouillon
B. oedematiens 14										
Nach 1 Tag	++	+	0	0	0	0	0	0	++	—
„ 1 Woche	+++	+	+	+	0	0	0	0	+++	—
„ 1 Monat	±	0	0	0	0	0	0	0	±	—
B. oedematiens 15										
Nach 1 Tag	++	++	0	0	0	0	0	0	++	—
„ 1 Woche	++	+++	+	0	0	0	0	0	++	—
„ 1 Monat	+	+	+	0	0	0	0	0	+	—
B. oedematiens 314										
Nach 1 Tag	+++	++	0	0	0	0	0	0	++	—
„ 1 Woche	+++	+++	++	0	0	0	0	0	+++	—
„ 1 Monat	+	0	0	0	0	0	0	0	+	—
B. hemolyticus 21										
Nach 1 Tag	±	0	0	0	0	0	0	0	++	—
„ 1 Woche	++	+	0	0	0	0	0	0	+++	±
„ 1 Monat	++	±	0	0	0	0	0	0	++	—
B. hemolyticus 22										
Nach 1 Tag	±	0	0	0	0	0	0	0	+++	—
„ 1 Woche	++	0	0	0	0	0	0	0	+++	—
„ 1 Monat	+	0	0	0	0	0	0	0	++	—
B. gigas 23										
Nach 1 Tag	+	0	0	0	0	0	0	0	+++	—
„ 1 Woche	++	±	0	0	0	0	0	0	++	—
„ 1 Monat	+	±	±	0	0	0	0	0	++	—
B. gigas 24										
Nach 1 Tag	±	0	0	0	0	0	0	0	++	—
„ 1 Woche	++	±	0	0	0	0	0	0	+++	—
„ 1 Monat	+	+	±	0	0	0	0	0	++	—

als nicht mehr entwicklungsfähig, wogegen B. gigas und B. Sordellii bei dieser Alkoholkonzentration — wenn auch in spärlichem Ausmaße — noch gediehen. Eine relativ hohe Alkoholtoleranz zeigten B. perfringens, B. oedematiens und in geringerem Grade auch B. histolyticus. Die geringste Wachstumshemmung übte der Alkohol gegenüber den sporulierenden, apathogenen Aerobiern (B. subtilis und B. mesentericus) aus, indem diese Keime noch in einem 40% Alkohol enthaltenden Nährmilieu ein deutliches, wenn auch geringfügiges Vermehrungsvermögen besaßen. Wahrscheinlich ist diese ausgesprochene Alkoholtoleranz auf die Bildung einer oberflächlichen Kahmhaut zurückzuführen. 2. Daß Stämme, die ein und derselben Bakterienart angehören, gegenüber Alkohol nahezu dieselbe Empfindlichkeit besitzen. Eine Ausnahme hiervon machten lediglich

Tabelle 5.

Gruppe Proteolytischer Anaerobier.

	Alkohol in Volumprozenten								Kontrolle	
	5%	10%	15%	20%	25%	30%	35%	40%	Leber-B.	Bouillon
B. Sordellii 13/7										
Nach 1 Tag	+	±	0	0	0	0	0	0	+++	—
„ 1 Woche	++	+	0	0	0	0	0	0	+++	—
„ 1 Monat	+	±	±	0	0	0	0	0	+++	—
B. Sordellii 13/8										
Nach 1 Tag	+	0	0	0	0	0	0	0	+++	—
„ 1 Woche	+	+	0	0	0	0	0	0	+++	—
„ 1 Monat	+	0	0	0	0	0	0	0	+++	—
B. histolyticus 8 I										
Nach 1 Tag	+	0	0	0	0	0	0	0	++	—
„ 1 Woche	++	0	0	0	0	0	0	0	++	—
„ 1 Monat	+	0	0	0	0	0	0	0	±	—
B. histolyticus 8 II										
Nach 1 Tag	+	±	±	0	0	0	0	0	++	—
„ 1 Woche	++	±	+	+	0	0	0	0	++	±
„ 1 Monat	+	±	0	0	0	0	0	0	+	—
B. histolyticus 9 I										
Nach 1 Tag	+	0	0	0	0	0	0	0	++	—
„ 1 Woche	++	+	+	±	0	0	0	0	++	±
„ 1 Monat	+	+	0	0	0	0	0	0	±	—
B. histolyticus 9 II										
Nach 1 Tag	±	0	0	0	0	0	0	0	++	—
„ 1 Woche	++	±	0	0	0	0	0	0	++	—
„ 1 Monat	+	0	0	0	0	0	0	0	+	—

Tabelle 6.

B. tetani-Gruppe.

	Alkohol in Volumprozenten								Kontrolle	
	5%	10%	15%	20%	25%	30%	35%	40%	Leber-B.	Bouillon
B. tetani 25										
Nach 1 Tag	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—
„ 1 Woche	++	±	0	0	0	0	0	0	++	—
„ 1 Monat	+	0	0	0	0	0	0	0	++	—
B. tetani 26										
Nach 1 Tag	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—
„ 1 Woche	+	±	0	0	0	0	0	0	+++	—
„ 1 Monat	±	0	0	0	0	0	0	0	+++	—
B. tetani 427										
Nach 1 Tag	0	0	0	0	0	0	0	0	±	—
„ 1 Woche	+	±	0	0	0	0	0	0	++	±
„ 1 Monat	±	0	0	0	0	0	0	0	++	—

Tabelle 7.

Gruppe der aeroben Sporenbildner.

	Alkohol in Volumprozenten								Kontrolle Bouillon
	5%	10%	15%	20%	25%	30%	35%	40%	
B. anthracis Gutknecht									
Nach 1 Tag	±	0	0	0	0	0	0	0	++
„ 1 Woche	+	+	+	+	+	0	0	0	+++
„ 1 Monat	+	0	0	0	0	0	0	0	+++
B. anthracis Steffen									
Nach 1 Tag	0	0	0	0	0	0	0	0	+
„ 1 Woche	+	+	±	+	0	0	0	0	+++
„ 1 Monat	+	0	0	0	0	0	0	0	+++
B. subtilis S 1									
Nach 1 Tag	±	0	0	0	0	0	0	0	+++
„ 1 Woche	+++	+	±	+	±	+	±	±	+++
„ 1 Monat	++	+	0	0	0	0	0	0	++
B. subtilis S 2									
Nach 1 Tag	±	0	0	0	0	0	0	0	+++
„ 1 Woche	+++	±	±	±	±	±	±	0	+++
„ 1 Monat	+	0	0	0	0	0	0	0	++
B. mesentericus M 1									
Nach 1 Tag	0	0	0	0	0	0	0	0	+
„ 1 Woche	+++	±	±	±	+	++	++	+	+++
„ 1 Monat	+++	0	0	0	0	0	0	0	+++

Tabelle 8.

	Alkohol in Volumprozenten							
	5%	10%	15%	20%	25%	30%	35%	40%
B. perfringens A, B, C, D	+++	+++	+++	+	0	0	0	0
B. ovitoxicus	+++	+++	++	0	0	0	0	0
B. Vibrion septique	++	+	0	0	0	0	0	0
B. Chauvoei	+++	(+)	0	0	0	0	0	0
B. oedematiens	+++	+++	++	(+)	0	0	0	0
B. hemolyticus	++	(+)	0	0	0	0	0	0
B. gigas	++	+	±	0	0	0	0	0
B. Sordellii	++	+	(±)	0	0	0	0	0
B. histolyticus	++	(+)	(+)	(+)	0	0	0	0
B. tetani	+	±	0	0	0	0	0	0

die verschiedenen Histolyticusstämme, deren Alkoholtoleranz von Stamm zu Stamm erheblich variierte. 3. Daß der Alkohol in den eben noch tolerierten Konzentrationen bei den einen Keimarten — B. perfringens, B. oedematiens — die Geschwindigkeit der Keimvermehrung kaum beeinflußt, bei andern Arten und Stämmen — B. hemolyticus, B. gigas, B. Sordellii, aerobe Sporenbildner — dagegen erheblich verlangsamt.

3. Bakterizide Wirkung von Äthylalkohol auf anaerobe bzw. aerobe Sporenbildner.

Auf die hohe Resistenz bakterieller Sporen gegenüber Äthylalkohol wurde wiederholt hingewiesen. So geht aus den Untersuchungen von Koch (11), Minervini (14), Ruß (19), Beyer (3) und Weigl (26) hervor, daß Milzbrandsporen im Alkohol über mehrere Wochen, im Maximum bis zu 110 Tagen entwicklungsfähig bleiben. Heim (8) vermochte sogar aus einem mit Milzbrandsporen infizierten Alkohol noch nach 20 Jahren lebende und vollvirulente Milzbrandbazillen zu gewinnen. Andere Sporenbildner, wie Heubazillen (Minervini (14), Portier (17)) oder Tetanusbazillen (Moll (15), Tizzoni und Cattani (24)) vermögen ebenfalls im Alkohol über längere Zeit zu überleben. Der Nachweis von Bakteriensporen (Neppi (16), van der Kamp (9)) im Alkohol bzw. die Isolierung von Sporenbildnern aus Alkoholproben (Stokvis, Knorr, Schoop, Konrich, Venohr) ist deshalb auch wiederholt gelungen.

a) Dauer der Lebensfähigkeit von Sporenbildnern in Alkohol-Bouillon-Gemischen bei 37° C.

Die keimtötende Wirkung von Bouillon-Alkoholgemischen (10 bis 90% Alkohol enthaltend) wurde gegenüber 32 Stämmen von Sporenbildnern geprüft.

Technik: Der Alkohol und seine Verdünnungen wurden wie in den vorliegenden Versuchen hergestellt. Jeder Nährboden enthielt eine Menge von 30 ccm Alkohol-Bouillon bzw. Alkohol-Tarozzibouillon. Um das Verdunsten von Alkohol zu verhüten, wurden die Nährböden mit Paraffinöl überschichtet (Röhrchen mit 10—40% Alkoholgehalt) oder die Röhrchen (mit über 40% Alkoholgehalt) mit paraffinierten Wattepfropfen verschlossen. Die Beimpfung sämtlicher Medien erfolgte mit 3tägigen Kulturen. In Intervallen von 1, 2, 3, 4 Wochen bzw. nach 2, 3 und 12 Monaten wurden 6—8 Tropfen aus jeder Probe entnommen und auf ca. 10—12 ccm Bouillon bzw. Tarozzibouillon überimpft und diese Kulturen täglich während 3—8 Tagen auf eingetretenes Wachstum geprüft.

Die erzielten Versuchsergebnisse sind in den nachfolgenden Tabellen (9—14) zusammengestellt. In diesen Tabellen bedeuten:

die arabischen Zahlen (1, 2, 3): die Abtötungszeit in Wochen,
die römischen Zahlen (I, II, III, XII): die Abtötungszeit in Monaten,
die Bezeichnung — : keine Abtötung bzw. Überleben,
·/· : nicht verwertbare Proben,
(—): Röhrchen, die bis zu 3 Monaten noch lebende Keime enthielten, später jedoch unbrauchbar wurden.

Tabelle 9.

B. perfringens-Gruppe.

	Alkohol in Volumprozenten								
	10	20	30	40	50	60	70	80	90
B. perfringens A 1	3	1	1	1	1	1	1	1	1
,, A 2	2	1	1	1	1	1	1	1	1
,, B 4	1	1	1	1	1	1	1	1	1
,, B 304	1	1	1	1	1	1	1	1	1
,, C 5	1	1	1	1	1	1	1	1	1
,, C 305	1	1	1	1	1	1	1	1	1
,, D 6	3	1	1	1	1	1	1	1	1
,, D 306	3	3	1	3	2	1	3	1	1
B. ovitoxicus 7	2	1	1	1	1	1	1	1	1

Tabelle 10.

Vibrion septique-Gruppe.

	Alkohol in Volumprozenten								
	10	20	30	40	50	60	70	80	90
Vibrion septique 13 I	—	—	—	3	3	III	III	III	III
,, ,, 312	—	—	—	II	·/·	XII	III	·/·	II
B. Chauvoei 18	(—)	(—)	II	3	2	3	3	I	II
,, 20	-	—	III	I	3	3	II	II	II

Tabelle 11.

B. Novyi-Gruppe.

	Alkohol in Volumprozenten								
	10	20	30	40	50	60	70	80	90
B. oedematiens 14	—	—	—	—	(—)	XII	II	II	3
,, 15	—	—	—	—	—	·/·	—	III	II
,, 314	—	—	—	—	—	—	—	—	—
B. hemolyticus 21	1	1	1	1	1	1	1	1	1
,, 22	—	—	—	2	1	1	3	(—)	III
B. gigas 23	—	—	—	—	XII	(—)	—	(—)	(—)
,, 24	—	—	—	3	3	3	3	3	3

Tabelle 12.

Gruppe der proteolytischen Anaerobier.

	Alkohol in Volumprozenten								
	10	20	30	40	50	60	70	80	90
B. Sordellii 13/7	—	—	—	—	—	—	(—)	(—)	(—)
,, 13/8	1	I	3	2	1	1	1	3	1
B. histolyticus 8 II	—	—	—	—	—	—	II	II	I
,, 9 I	—	—	—	—	XII	XII	XII	II	II
,, 9 II	—	—	—	—	XII	XII	XII	XII	II

Tabelle 13.

B. tetani.

	Alkohol in Volumprozenten								
	10	20	30	40	50	60	70	80	90
B. tetani 25	—	2	2	2	2	1	1	1	2
„ 26	—	—	—	—	—	(—)	—	III	II
„ 427	2	2	1	1	1	1	1	1	1

Tabelle 14.

Gruppe von aeroben Sporenbildern.

	Alkohol in Volumprozenten								
	10	20	30	40	50	60	70	80	90
B. anthracis Steffen	—	—	XII	XII	XII	(—)	(—)	(—)	I
„ Gutknecht	—	—	—	XII	(—)	(—)	(—)	(—)	(—)
B. subtilis S 1	—	—	—	—	—	(—)	—	(—)	III
„ S 2	—	—	—	—	—	(—)	(—)	XII	III
B. mesentericus M 1	—	XII	XII	XII	XII	XII	I	XII	II

Aus der Gesamtheit der erzielten Versuchsergebnisse geht ohne Zweifel hervor, daß der Alkohol nur ein geringfügiges sporulizides Vermögen besitzt; die meisten Sporenbildner bzw. deren Sporen blieben auch in höheren Alkoholkonzentrationen während Wochen und Monaten lebens- bzw. keimfähig. Die Größe der Alkoholtoleranz schwankte nicht nur von Art zu Art (aerobe Sporenbildner > B. oedematiens, B. histolyticus > B. perfringens), sondern auch innerhalb einer Art von Stamm zu Stamm (B. tetani, B. Sordellii). Wahrscheinlich ist hierfür das wechselnde Sporenbildungsvermögen einzelner Arten bzw. Stämme verantwortlich.

Errechnet man die durchschnittliche Lebensdauer der untersuchten Sporenarten in Abhängigkeit von der Alkoholkonzentration, so kommt man zu folgendem Ergebnis:

Tabelle 15.

	Alkohol in Volumprozenten								
	10	20	30	40	50	60	70	80	90
Durchschnittl. Lebensdauer in Monaten	10,2	9,8	9,4	7,5	6,9	5,4	4,9	4,0	2,7

In der getroffenen Versuchsanordnung (Prüfung der Bakterizidie in Bouillon-Alkoholgemischen) nimmt demnach die Lebensdauer der geprüften Sporen mit zunehmender Alkoholkonzentration ab, m. a. W., die sporulizide Wirkung ist umso größer, je höhere Alkohol-

konzentrationen verwendet werden. Die durchschnittliche Lebensdauer von Sporen beträgt jedoch selbst in 90% Alkohol noch ungefähr 3 Monate.

b) Dauer der Lebensfähigkeit von Sporenbildnern in Alkohol-Wassergemischen bei Zimmertemperatur.

Die Versuchsanordnung entspricht der vorherigen mit dem einen Unterschied, daß nicht Nährbouillon sondern Aq. dest. (pH 7,2) als Verdünnungsmittel des Alkohols verwendet wurde, und daß die Proben nicht bei 37° C sondern bei Zimmertemperatur gehalten wurden.

Die bakterizide bzw. sporulizide Kraft des Alkohols (10—99,4%) wurde gegenüber insgesamt 12 Sporenbildnerarten geprüft, wobei die Versuchsdauer auf 3 Monate bemessen wurde. Über das Versuchsresultat orientiert Tabelle 16.

Tabelle 16.

	Alkohol in Volumprozenten									
	10	20	30	40	50	60	70	80	90	99,4
B. perfringens A 1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Vibrion septique 312	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
B. Chauvoei 18	—	—	—	—	—	—	—	II	II	II
B. oedematiens 314	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
B. hemolyticus 21	—	—	—	—	III	—	—	III	—	II
B. gigas 23	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
B. Sordellii 13/7	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
B. histolyticus 9 I	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
B. tetani 26	—	—	—	—	—	—	—	—	III	—
B. anthracis Steffen	—	—	—	—	—	—	—	II	III	II
B. subtilis S 2	—	—	—	—	—	—	—	—	II	II
B. mesentericus M 1	—	—	—	—	—	II	II	III	II	I

Das Versuchsresultat bestätigt die früheren Untersuchungsergebnisse. Wiederum wurde festgestellt, daß der Alkohol auch in den höchsten Konzentrationen eine geringfügige desinfizierende Wirkung auf sporulierende Keime ausübt; jedenfalls konnten noch nach 3monatlicher Alkoholeinwirkung keimfähige Sporen pathogener Anaerobier, auch in den Gemischen mit größtem Alkoholgehalt, in den meisten Fällen nachgewiesen werden.

Der wiederum erhobene Befund, daß die desinfizierende Kraft des Alkohols mit zunehmender Alkoholkonzentration ansteigt, steht in Übereinstimmung mit entsprechenden Angaben von Sottile (22), Schumburg (21a, b), Winkler (27), Ruß (19), Weigl (26) und Hansen (6), weicht dagegen von den Versuchsergebnissen von Konrich (12a), Beyer (3), Epstein (4), Minervini (14), Ba-

terelli (2), Barsikow (1), Harrington und Walker (7), Frey (5) u. a. insofern ab, als sich diese Autoren davon überzeugten, daß hochkonzentrierter Alkohol als Desinfiziens häufig versagt, in 70-, 60-, 50- und sogar 40proz. Konzentration dagegen ausgesprochen bakterizide Eigenschaften hat. Höchstwahrscheinlich erklärt sich dieser Widerspruch dadurch, daß — nach Frey (5) — das bakterizide Vermögen des Alkohols an zwei Vorgänge gebunden ist, nämlich, erstens an die Eigenschaft des Alkohols, das bakterielle Protoplasma zu koagulieren, eine Wirkung, die zweifellos mit steigender Alkoholkonzentration zunimmt, und zweitens an die Eindringungskraft des Alkohols, die mit zunehmender Konzentration geringer wird; die Zone der maximalen Wirkung dieser beiden Faktoren liegt deshalb, falls nichtsporulierende Testbakterien in trockenem Zustand der Alkoholwirkung ausgesetzt werden, bei einer Alkoholkonzentration von 60—70%. Wird dagegen der bakterizide Effekt von Alkohol gegenüber flüssigen Bakterienkulturen wie in den angeführten Versuchen untersucht, so kommt den hohen Alkoholkonzentrationen die stärkste Wirkung zu. Hierzu kommt, daß das Eindringungsvermögen des Alkohols gegenüber den äußerst wasserarmen Bakteriensporen wohl überhaupt keine Rolle spielt, ein Umstand, der wohl auch die große Alkoholresistenz dieser Dauerformen zur Genüge erklärt.

c) Dauer der Lebensfähigkeit von pathogenen Anaerobiern an künstlich infizierten, in Alkohol eingelegten Instrumenten.

In dieser Versuchsserie sollten die in der Praxis bestehenden Verhältnisse nach Möglichkeit nachgeahmt werden. Zu diesem Zwecke wurde die folgende Versuchsanordnung getroffen:

Eine Anzahl großer, flacher, im Heißluftsterilisator sterilisierter Glasschalen wurde mit den verschiedenartigsten, ebenfalls sterilisierten Instrumenten (Pinzetten, Skalpelle, Sonden, Klammern, Punktionsnadeln, Lanzetten und zerlegten Spritzenbestandteilen) beschickt. Der Schaleninhalt wurde hierauf mit je 500 ccm eines 70proz., mit B. perfringens, Vibrion septique, B. Chauvoei, B. oedematiens und B. tetani künstlich infizierten (im Maximum 100 Keime pro 1 ccm) Alkohols übergossen und hierauf in verschlossenem Zustand bei Zimmertemperatur gehalten. In bestimmten Zeitintervallen wurde den Gefäßen Instrumente und 1 ccm Alkohol entnommen und in Tarozzibouillon übertragen.

Die hierbei erzielten Versuchsergebnisse sind in Tabelle 17 angeführt.

Entgegen der Erwartung und der praktischen Erfahrung erwies sich B. perfringens auch in dieser Versuchsanordnung als äußerst hinfällig. Wie schon erwähnt, erklärt sich dieser Befund wohl durch das geringe Sporenbildungsvermögen des von uns verwendeten

Tabelle 17.

	Überimpft nach	Spritzenanteil	Kanüle	Instrument	Alkoholprobe
B. perfringens B 4	1 Tag	—	—	—	—
	4 Tagen	—	—	—	—
	1 Woche	—	—	—	—
	2 Wochen	—	—	—	—
	1 Monat	—	—	—	—
Vibrion septique 312	1 Tag	+	+	+	+
	4 Tagen	+	+	+	+
	1 Woche	+	+	+	+
	2 Wochen	+	+	+	—
	1 Monat	+	+	—	—
B. Chauvoei 20	1 Tag	+	+	+	+
	4 Tagen	+	+	+	—
	1 Woche	+	+	+	—
	2 Wochen	+	+	+	—
	1 Monat	+	+	+	—
B. oedematiens 4	1 Tag	+	+	+	+
	4 Tagen	+	+	+	+
	1 Woche	+	+	+	+
	2 Wochen	—	—	—	—
	1 Monat	—	—	—	—
B. tetani 26	1 Tag	+	+	+	+
	4 Tagen	+	+	+	—
	1 Woche	+	+	+	—
	2 Wochen	+	+	—	—
	1 Monat	—	—	—	—

Stammes. Dagegen konnten an den mit Vibrion septique und B. Chauvoei infizierten Instrumenten noch nach einem Monat entwicklungsfähige Keime nachgewiesen werden, während der Alkohol um diese Zeit bereits steril war. Eine etwas geringere Lebensdauer wurde für B. oedematiens und B. tetani nachgewiesen.

Auch dieser Versuch erlaubt demnach die Schlußfolgerung, daß die in der Praxis häufig geübte Konservierung von Instrumenten in Alkohol zur Vernichtung menschenpathogener Anaerobier nicht geeignet ist.

Zusammenfassung.

1. Der im Handel befindliche und zu Desinfektionszwecken verwendete Alkohol ist meistens nicht steril, sondern enthält keimfähige Sporen von aeroben und anaeroben, auch menschenpathogenen (B. perfringens) Keimen.

2. Die entwicklungshemmende Wirkung des Alkohols machte sich gegenüber den geprüften Sporenbildnern in unterschiedlichem Ausmaß geltend. Die größte Alkoholtoleranz wurde bei saprophytären

aeroben Keimarten (B. subtilis, B. mesentericus) beobachtet; die Entwicklungsfähigkeit dieser Sporenbildner ist selbst in einem 40% Alkohol enthaltenden Nährboden — wahrscheinlich zufolge der Bildung einer oberflächlichen Kahmhaut — nicht völlig aufgehoben. Unter den pathogenen Anaerobiern zeigten B. perfringens und B. oedematiens die größte Toleranz; eine Vermehrung dieser Keimart war noch in Nährmedien von 20% Alkoholgehalt möglich.

3. Die sporulizide Wirkung des Alkohols ist um so größer, je höhere Alkoholkonzentrationen verwendet werden. Auch unter den optimalsten Versuchsbedingungen besitzt jedoch der Alkohol nur ein geringfügiges sporulizides Vermögen. Die durchschnittliche Lebensdauer von Sporen aerober und anaerober Bakterienarten beträgt in hochkonzentriertem Alkohol ca. 3 Monate.

4. Die geringe Desinfektionskraft des Alkohols zeigte sich auch in Versuchen, in denen künstlich — mit pathogenen Sporenbildnern — infizierte Instrumente der Alkoholeinwirkung ausgesetzt wurden.

5. Für die Praxis ergibt sich aus den angestellten Untersuchungen, daß die Desinfektion von Instrumenten und Injektionsspritzen in Alkohol unzuverlässig und ungenügend ist und wegen der stets vorhandenen Infektionsmöglichkeit mit menschenpathogenen Anaerobiern abgelehnt werden muß.

Literatur.

1. Barsikow, Pharmazeut. Ztg. 1901, Nr. 5. — 2. Baterelli, Policlinico 1900, 1. X. — 3. Beyer, Z. Hyg. **70**, 225 (1912). — 4. Epstein, Z. Hyg. **24**, 1 (1897). — 5. Frey, D. med. Wschr. 1912, 1633. — 6. Hansen, Zbl. Bakt. I Orig. **45**, 466 (1908). — 7. Harrington u. Walker, zit. nach Ruß (19). — 8. Heim, Lehrbuch der Bakteriologie, 1922, S. 128. — 9. van der Kamp, Zbl. Bakt. I. Ref. **113**, 190 (1934). 10. Knorr, Münchner med. Wschr. 1932, 793. — 11. Koch, Mitt. a. d. R.G.A. 1881, 263. — 12. Konrich, a) D. med. Wschr. 1925, 1733. b) Arb. a. d. Reichsgesundheitsamt **67**, 271 (1935). — 13. Kuhn, Münchner med. Wschr. 1932, 790. — 14. Minervini, Z. Hyg. **29**, 117 (1898). — 15. Moll, Zbl. Bakt. I. Orig. **84**, 416 (1920). — 16. Neppi, Boll. Ist. Sieroter. milan. **13**, 877 (1934). — 17. Portier, C. R. Acad. Sci. **161**, 397 (1915). — 18. Regamey, Schweiz. med. Wschr. 1939. — 19. Ruß, Zbl. Bakt. I. Orig. **37**, 280 (1904). — 20. Schoop, a) D. tierärztl. Wschr. 1934, 752. b) Tierärztl. Rundschau 1936, 826. — 21. Schumburg, a) D. med. Wschr. 1912, 103. b) D. med. Wschr. 1926, 2196. — 22. Sottile, Zbl. Bakt. I. Ref. **56**, 244 (1913). — 23. Stokvis, Zbl. Bakt. I. Orig. **48**, 436 (1909). — 24. Tizzoni u. Cattani, Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol. **28**, 41 (1890). — 25. Venohr, Zbl. Bakt. I. Ref. **123**, 380 (1936). — 26. Weigl, Arch. f. Hyg. **44**, 292 (1902). — 27. Winkler, Inaug.-Dissert. Marburg 1899.